

173

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1897

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le Jeudi 11 Février 1897, à 1 heure

PAR

G. SÉNÈQUE

Né à l'Île Maurice, le 25 Avril 1870

DE L'ÉTUDE COMPARATIVE

DE LA

STÉRILISATION DU LAIT

Président : M. DEBOVE, professeur.

Juges : MM. MATHIAS-DUVAL, professeur.
NETTER et ACHARD, agrégés.

*Le candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur
les diverses parties de l'enseignement médical.*

PARIS

Imprimerie de la Faculté de Médecine

HENRI JOUVE

15, Rue Racine, 15

1897

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1897

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le Jeudi 11 Février 1897, à 1 heure

PAR

G. SÉNÈQUE

Né à l'Île Maurice, le 25 Avril 1870

DE L'ÉTUDE COMPARATIVE

DE LA

STÉRILISATION DU LAIT

Président : M. DEBOVE, professeur.

Juges : MM. MATHIAS-DUVAL, professeur.

NETTER et ACHARD, agrégés.

*Le candidat répondra aux questions qui lui seront faites sur
les diverses parties de l'enseignement médical.*

PARIS

Imprimerie de la Faculté de Médecine

HENRI JOUVE

15, Rue Racine, 15

1897

FACULTÉ DE MEDECINE DE PARIS

	Doyen	M. BROUARDEL
	Professeurs	MM.
Anatomie		FARABEUF.
Physiologie		CH. RICHET.
Physique médicale		GARIEL.
Chimie organique et chimie minérale		GAUTIER.
Histoire naturelle médicale		N.
Pathologie et thérapeutique générales		BOUCHARD.
Pathologie médicale		DIEULAFOY.
		DEBOVE.
Pathologie chirurgicale		LANNELONGUE
Anatomie pathologique		CORNIL.
Histologie		Mathias DUVAL
Opérations et appareils		TERRIER.
Pharmacologie		FOUCHET.
Thérapeutique et matière médicale		LANDOUZY.
Hygiène		PROUST.
Médecine légale		BROUARDEL.
Histoire de la médecine et de la chirurgie		LABOULBÈNE.
Pathologie expérimentale et comparée		N.
		N.
Clinique médicale		POTAIN.
		JACCOUD.
		HAYEM.
		GRANCHER.
Maladies des enfants		JOFFROY.
Clinique de pathologie mentale et des maladies de l'encéphale		FOURNIER.
Clinique des maladies syphilitiques		RAYMOND.
Clinique des maladies nerveuses		BERGER.
		DUPLAY.
Clinique chirurgicale		LE DENTU.
		TILLAUX.
Clinique ophthalmologique		PANAS.
Clinique des maladies des voies urinaires		GUYON
Clinique d'accouchement		TARNIER.
		PINARD.

Professeur honoraire.. M. PAJOT.

Agréés en exercice :

MM.	MM.	MM.
ACHARD.	GLEY.	RICARD.
ALBARRAN.	HARTMANN.	ROGER.
ANDRE.	HEIM.	SEBILEAU.
BAR.	LEJARS.	THIERY.
BONNAIRE.	LETULIE.	THOINOT.
BROCA.	MARFAN.	TUFFIER.
CHANTEMESSE.	MARIE.	VARNIER.
CHARRIN.	MENETRIER.	WALTER.
CHASSEVANT.	NELATON.	WEISS.
DELBET.	NETTER.	WIDAL.
GAUCHER.	POIRIER, chef des	WURTZ.
GILBERT.	trav. anatomiques.	
GILLES DE LA TOURETTE.	REITTERER.	

SECRÉTAIRE DE LA FACULTÉ : M. CH. PUPIN.

Par délibération, en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

173

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR DEBOVE

Médecin à l'Hôpital Beaujon
Membre de l'Académie de médecine
Chevalier de la Légion d'honneur

INTRODUCTION

C'est pendant que nous suivions son service à la Maternité de la Charité, que notre maître, M. Porak, nous suggéra l'idée de revoir les diverses méthodes de stérilisation du lait, nous engageant à rechercher, au moyen de cultures, quel était l'appareil le plus propre à réaliser les deux desiderata suivants : enlever au lait les germes nocifs dont il pourrait être le véhicule, et lui laisser ses principes chimiques et ses qualités physiologiques.

Mais nous nous sommes bientôt aperçu que c'était là un champ d'études trop vaste. Il aurait fallu répéter toutes les expériences déjà faites sur ce sujet, et leur nombre est considérable. Les difficultés qui nous sont apparues au commencement de notre travail nous ont ainsi forcé à éliminer bien des appareils, et à nous limiter à ceux qui nous paraissaient les plus simples.

Car, tout en cherchant le côté scientifique de la question, nous ne perdions pas de vue le but principal de nos recherches : c'était le choix d'un appareil ne nécessitant pas les manipulations multiples, que réclament ceux employés dans l'industrie ou dans les laboratoires. Le grand nombre d'appareils et de méthodes inventés prouve que la stérilisation du

lait laisse encore beaucoup à désirer. On peut donc affirmer, sans crainte d'être démenti, qu'il reste encore beaucoup à faire, et que la stérilisation du lait demande à être encore beaucoup étudiée.

En entreprenant ce travail, nous sommes loin de conseiller l'élevage de tous les enfants au lait stérilisé. Toutes les sommités médicales sont d'accord sur ce point, que l'allaitement maternel est ce qu'il y a de mieux. Il a d'ailleurs ce grand avantage, qu'il profite mieux aux enfants. Lorsque par suite de circonstances de santé, ou tout autre motif, la mère ne peut nourrir son enfant, elle doit le confier à une nourrice. Ce n'est seulement que quand la mère ne peut ni nourrir son enfant, ni se procurer une nourrice qu'il faut avoir recours à l'allaitement artificiel.

On jugera peut-être téméraire de notre part d'avoir choisi un tel sujet, à cela nous répondrons que ce travail n'est pas une œuvre de simple critique, c'est l'exposé de nos recherches, et que si notre expérience n'est pas vieille, nous avons tâché d'y suppléer par une observation patiente et rigoureuse, et que nous avons été dirigé dans cette voie par notre chef M. Porak accoucheur des hôpitaux, et par M. le Docteur G. Durante, chef du laboratoire de la maternité de la Charité.

Notre étude sera donc divisée en quatre parties.

Dans un premier chapitre nous ferons simple-

ment et rapidement l'historique de la stérilisation du lait.

Dans un deuxième chapitre nous donnerons quelques considérations générales sur la question, tout en effleurant les diverses affections où le lait pourrait être incriminé.

Un troisième chapitre sera consacré au manuel opératoire des diverses méthodes, surtout des plus usuelles.

Enfin un dernier chapitre contiendra les résultats de nos recherches.

Au moment d'aborder l'étude de notre sujet, il est de notre devoir d'adresser l'hommage de notre reconnaissance à tous ceux qui, pendant le cours de nos études, ont bien voulu encourager nos efforts.

Nous avons été heureux de bénéficier des savantes leçons de MM. les professeurs Duplay et Panas, nous nous empressons de leur offrir nos plus vifs remerciements.

Nous avons aussi suivi les services de MM. Faisans, Gouraud, Bar, qu'ils reçoivent, ici, l'assurance de notre profonde gratitude.

M. Monod, agrégé à la faculté de médecine a bien voulu nous admettre dans son service, nous avons gardé bon souvenir de son enseignement si clair qu'il ne dédaignait pas de mettre à la portée des jeunes.

M. Achard, professeur agrégé à la faculté de

médecine a été plus qu'un maître pour nous. Nous sommes heureux de pouvoir aujourd'hui lui offrir le témoignage de notre profonde reconnaissance pour les marques de bienveillance et de sympathie qu'il n'a cessé de nous prodiguer en toutes circonstances.

Si notre travail a quelque valeur, nous sommes heureux d'en rapporter tout l'honneur à notre maître M. Porak, que nous avons trouvé toujours si bienveillant pour nous. Qu'il nous permette de lui témoigner ici notre grande reconnaissance.

Nous devons aussi remercier M. le Docteur G. Durante d'avoir bien voulu nous guider dans ce travail. Qu'il soit assuré de notre dévouement pour ses conseils si éclairés.

M. Duclaux de l'Institut Pasteur a bien voulu nous communiquer quelques renseignements bibliographiques; nous lui en sommes très reconnaissant.

C'est sous l'inspiration de M. le Docteur Henri Lorans, médecin en chef de l'Asyle Barkly, à l'Ile Maurice, que nous avons commencé nos études médicales. Nous tenons tout particulièrement à le remercier des bons principes qu'il a su nous inculquer. Nous nous efforcerons de toujours mettre en pratique les sages conseils qu'ils nous a prodigués.

Monsieur le Professeur Debove a bien voulu accepter la présidence de notre thèse; c'est un grand honneur qu'il nous fait, et nous lui exprimons ici toute notre reconnaissance.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

Le lait est l'aliment par excellence du jeune âge. Ce n'est que lorsque, pour une cause ou une autre, la mère ne peut ni allaiter son enfant, ni le confier à une nourrice, qu'elle doit se résoudre à le nourrir artificiellement.

Depuis déjà fort longtemps, on a remarqué que le lait occasionnait parfois de graves désordres de santé chez les nourrissons ; on attribuait alors sa nocivité à toutes autres causes que la vraie, la théorie microbienne n'ayant pas encore fait son apparition. Gay-Lussac, un des premiers, proposa l'ébullition comme moyen de conservation, mais le lait se couvre alors d'une couche de caséine devenue insoluble, et cette conservation n'est obtenue qu'aux dépens de sa saveur et de sa composition.

Depuis que Pasteur, dans ses mémorables travaux, a étudié et décrit le *fermentum lactosum*, ferment déjà signalé par Remak et Blondeau, et a prouvé que les germes de ce ferment n'appartenaient pas au lait, mais venaient bien de son contact avec l'air libre, que ce ferment se multipliait dans un milieu convenable, tel le lait, et qu'il transformait le sucre en acide lactique, on s'est demandé, si en

privant le lait de ce contact, on n'arriverait pas à le conserver indemne de toute fermentation.

La série de travaux que M. Duclaux a entrepris sur le même sujet a jeté un jour éclatant sur l'étude du lait, et a suscité de nombreuses expériences entreprises dans ce but.

Beaucoup se sont livrés à l'étude des micro-organismes du lait, et parmi ceux qui se sont occupés de la bactériologie du lait, nous pouvons citer MM. Ehrenberg et Bienstock pour les saprophytes, et MM. Marpmann, Grotenfeldt, Hueppe et Loeffler pour les pathogènes et leur mode de transmission.

La stérilisation du lait s'impose donc, et nombre d'appareils ont été inventés dans le but de détruire et les microbes saprophytes et les microbes pathogènes. On fait aussi de la pasteurisation du lait, mais elle ne vaut pas la stérilisation, car, si on détruit le microbe virulent lui-même, on ne parvient pas par cette méthode à annihiler ses spores.

Des expériences de stérilisation ont été entreprises par MM. Soxhlet, Escherich, Egli Sinclair, Gentile, Bethel et autres, mais, malgré les travaux de ces nombreux auteurs, la question reste encore à résoudre, car les résultats sont incomplets.

L'impossibilité est d'obtenir un lait, à la fois stérile, et possédant toutes ses qualités chimiques et physiologiques ; aussi nous sommes-nous borné à chercher le mode de stérilisation qui donne le lait le plus stérile et le moins altéré.

CHAPITRE 2

Considérations Générales

Le lait de vache, de beaucoup le plus employé pour l'alimentation des nouveaux-nés, provient, surtout dans les grands centres, d'industriels qui recueillent le lait de différents éleveurs. Ce n'est pas sans danger qu'on le fait voyager, et qu'on le transvase plusieurs fois. Les germes dont il s'est imprégné, soit pendant la traite, soit pendant les diverses opérations de transvasement, cultivent peu de temps après, surtout par le contact incessant d'air libre qu'éprouve le lait dans les laiteries qui le débitent.

Pour en retarder la fermentation, les laitiers ont l'habitude d'y ajouter du bicarbonate de soude. La loi, en effet, permet cette addition, mais malheureusement le taux toléré est souvent dépassé, et l'influence du bicarbonate de soude finit par se faire sentir à la longue. Le lait du reste s'altère très facilement sous l'influence de la température et de l'électricité de l'atmosphère, et ce, avec des variations dont il n'est pas toujours aisé de se rendre compte.

Sous cette influence atmosphérique, le lait devient milieu de culture, et les microbes qui s'y trouvent se développent, causent la fermentation du lait et peuvent engendrer différentes maladies.

Une des plus grandes sources d'infection du lait est le mouillage ; on peut dire que la plus grande partie du lait qu'on débite dans les grands centres a subi cette opération. Si l'eau employée était pure ou filtrée, le mal serait moindre ; malheureusement ce n'est pas le cas, et il existe des gens assez peu scrupuleux pour se servir de n'importe quelle eau. Hankins en inspectant des laiteries dans l'Inde, ayant vu des laitiers se servir de l'eau ordinaire, analysa les divers laits, et constata des proportions énormes de bactéries dans les laits coupés, tandis que leur nombre dans le lait pur ou coupé d'eau filtrée était beaucoup moindre.

Les microbes qui se rencontrent dans le lait peuvent se diviser en deux grandes classes, à savoir : d'une part les saprophytes, si multiples et si constants, qui proviennent très probablement du fumier, de la terre, etc., et qui passent pour n'avoir aucune action pathogène sur l'organisme humain, et d'autre part les pathogènes, qui proviennent soit de l'animal lui-même, soit des milieux douteux, et qui peuvent occasionner de graves désordres de la santé.

On comprend donc que le lait, tel qu'il est, ne

saurait être employé sans inconvénient, surtout pour l'alimentation d'êtres aussi délicats et aussi susceptibles vis-à-vis des espèces microbiennes que les nouveaux-nés. Si le lait nouvellement trait est le meilleur, cela tient probablement à ce qu'il n'a subi encore aucun travail d'acescence ou de dissociation de ses éléments.

Parmi les microbes qui se rencontrent le plus ordinairement dans le lait, nous pouvons citer : le *bacillus butyricus* (Hueppe), qui agit sur la caséine comme le labferment, dissolvant l'albumine et la transformant en peptone.

Le *bacillus acidi lactici*, agent de la fermentation, qui transforme la lactose en acide lactique et qui précipite la caséine ; le bacille lactique se rapproche du bactérium coli, dont il affecte à tel point les caractères, que Wurtz a pu considérer ces microbes comme étant les mêmes, mais modifiés par les milieux et des passages antérieurs.

Le *bactérium coli*, dont la virulence est si variable, a été retrouvé par Jensen dans le lait du commerce, et cet auteur soutient même que le choléra nostras et la diarrhée infantile, pourraient être dus à cet agent parasitaire.

Parmi les microbes dont les caractères se rapprochent du bactérium coli, ou qui peuvent lui être identifiés, outre le bacille lactique nous pouvons citer : le *bacillus mésentéricus vulgaris* (bacille de la

pomme de terre), qui agit comme le labferment et que M^{me} Strub a trouvé dans la plupart de ses analyses ; le *bacillus aérogènes*, identifié par Morelle ; le *bacillus antéritis*, de Gaertner, qui se transmet à l'homme par la viande et le lait.

Le *thyrothrix tenuis*, le *subtilis* et le *proteus*, attirent l'attention par la résistance de leurs spores à la chaleur. Les microbes adultes succombent, mais leurs spores demandent quelquefois une température de 115° pour être détruits. Ces microbes ne sont pas considérés comme pathogènes, mais le protéus, en particulier, tend de plus en plus à être assimilé à un microbe pathogène, ou plutôt à le devenir par suite d'associations diverses.

Nous citerons encore parmi ceux qu'on considère comme saprophytes, le *bacillum linbatum-acidi lactici* (Marpmann), le *micrococcus acidi lactici* et le *sphaerococcus acidi lactici* (Marpmann), le *bacillus lactis albus*, et le *bacillus liodermos* (Lœffler).

Parmi les bacilles modifiant la couleur du lait, nous avons le *bacillus cyanogénus* qui ne colore le lait en bleu qu'au bout de trente-six heures. Bourquelot dit qu'il est très rare pendant l'hiver. Steinhof relate le cas d'un lait bleu qui a duré pendant douze ans sans interruption dans une ferme ; le ferment ayant été cultivé, a donné des cultures soit bleues, soit incolores, mais ces cultures provoquaient toujours la coloration bleue du lait. Comme moyen

de préservation on a préconisé l'acide sulfureux, et des expériences ont été faites dans des fermes du nord de l'Allemagne; où on n'a constaté que des succès, en y faisant brûler du soufre, portes et fenêtres closes.

Le *bacillus erythrogènes* qu'on a aussi retrouvé dans les fécès des enfants, est un élément parasitaire du même ordre que le précédent, mais qui colore le lait en rouge. Nous n'insistons pas davantage sur ces détails; on considère ces microbes comme non pathogènes jusqu'ici. Le *vibrio syncyanus* qui colore le lait en jaune rentre aussi dans la même catégorie.

Quoique ces microbes soient considérés comme inoffensifs, il en est qui, comme le proteus, par leur association à d'autres microbes, peuvent devenir pathogènes. Nous croyons donc que, comme jusqu'ici leur étude est imparfaite, et leur inocuité relative, nous devons tenir compte de leur présence et essayer de nous en débarrasser.

Mais il est d'autres microbes qui, s'ils se trouvent dans le lait, ne s'y développent qu'à l'état d'acidité, et se servent de ce liquide plutôt comme véhicule; nombre d'affections se trouvent ainsi propagées. Si nous jetions un coup d'œil sur les maladies les plus communes de l'enfance, nous voyons, en y cherchant bien, que c'est le lait qui, le plus souvent, peut être incriminé.

La *diphtérie* a été observée en Angleterre, et les

épidémies de Yorktown, de Cumberley étaient dues, comme il a été prouvé par les enquêtes, à l'absorption du lait. Loeffler a constaté que le bacille de la diphtérie se développe très bien dans le lait; il est même arrivé à retrouver ce bacille dans du lait stérilisé quatre semaines après... (Par suite de stérilisation insuffisante).

La *diarrhée infantile* a été observée depuis longtemps en Amérique, où on lui donnait le nom de « Feeding bottle's disease ». Chavanne, dans sa thèse, pense que le lait pourrait être incriminé, malgré que les recherches de MM. Hénoc'h, Wilderhoffer, Hayem et Lesage, n'aient pas encore élucidé la question.

La *fièvre typhoïde*. Le lait comme véhicule du bacille d'Eberth n'est plus à prouver. L'épidémie qui éclatait à Montlignon, en 1894, en est une preuve indiscutable. Un laitier ayant lavé ses récipients dans un petit cours d'eau où avaient été blanchis des linges souillés par des typhiques, a ainsi propagé la maladie. Hesse a retrouvé le bacille d'Eberth dans du lait stérilisé (la stérilisation avait encore été insuffisante).

La *scarlatine*. — Certaines épidémies des environs de Londres semblent en démontrer la transmission. Cette transmission a été controversée, mais les résultats de l'enquête sur l'épidémie qui éclata aux environs de New-York, en 1890, ne laissent aucun

doute. En tout cas, le lait provenant d'une laiterie où existe un cas de scarlatine doit être rigoureusement proscrit.

La *fièvre aphtheuse*. — Pêtre, dans sa thèse, en affirme la transmission, et il cite nombre de cas à l'appui de cette assertion. M. le Professeur Proust admet également ce mode de transmission, et en cite des cas très démonstratifs recueillis chez des sujets soumis au régime lacté exclusif.

On donne le nom de *pommelière* à la tuberculose chez l'espèce bovine. La tuberculose peut, non-seulement se localiser aux poumons, mais aussi aux mamelles. Virchow se refuse à assimiler la tuberculose de la vache à la tuberculose humaine, mais Villemain conclut que la phthisie calcaire de l'espèce bovine est identique à la tuberculose de l'homme et cette opinion est aujourd'hui généralement admise. La contagion vient de l'encombrement, dit Spillmann, la tuberculose étant beaucoup plus fréquente chez les animaux soumis à la stabulation que chez ceux qu'on laisse pâturer en liberté. Le principal véhicule de la contagion est dit-il, la sécrétion nasale de ces animaux qui souillent les auges, mangeoires, etc., et qui, desséchée, puis soulevée sous forme de poussière, est inhalée par les animaux comme par les hommes. La localisation de la tuberculose aux mamelles, et le peu de soin qu'apportent les personnes chargées de traire la vache, constituent un danger d'autant plus grand

que nous ne nous mettons pas en garde contre cette éventualité.

La rareté des exemples de tuberculose acquise par le lait n'est seulement que la preuve que l'article 13 de la loi du 28 juin 1881, est assez bien observé ; mais il n'en est pas moins vrai que des faits très probants ont été recueillis sur cette transmission, témoin les douze cas rapportés par Creighton de Cambridge. Ernst après expériences sur dix huit vaches tuberculeuses, prétend que quelque soit le siège de la lésion, le lait est toujours contagieux.

Gillet dit que, même si le lait est bouilli à feu nu il garde tout, de même une virulence variable ; cependant Bollinger dit avoir vu rester sains des nourrissons élevés avec du lait de vaches reconnues tuberculeuses, et il cite à l'appui des autopsies de vaches et d'enfants. M. le Professeur Straus dit que, par la pasteurisation du lait, il est impossible de détruire sûrement le bacille de la tuberculose, mais nous trouvons cependant dans son livre sur la Tuberculose que Bang aurait démontré par des expériences qu'une température de 85°. pendant 5 minutes, suffisait à les détruire.

Enfin nous signalerons le *bacille de Vaughan et Perkins* isolé par ces auteurs dans des échantillons de crème et de fromage ayant donné lieu à des phénomènes d'intoxications graves, caractérisés par les douleurs épigastriques, des vomissements, de la diar-

rhée, du délire violent et une petitesse du poulx allant jusqu'à sa disparition presque complète.

C'est un bâtonnet se colorant par le gram aérobic et anéorobi, donnant sur la gélose des cultures d'un blanc porcelainé, sur la gélatine qu'il ne liquéfie pas, des cultures en clou jaunes à la surface et gris-bleu dans la profondeur avec production de bulles gazeuses, sur pommes de terre des cultures jaunes épaisses avec odeur acide. Enfin, il coagule le lait en 12 à 24 heures en donnant lieu à une odeur d'éther agréable. Il ne donne pas la réaction de l'indol.

Il est pathogène pour le chien, le chat et surtout le cochon d'inde, le rat et la souris.

Sa virulence est fortement augmentée par les passages à travers les animaux. On peut ainsi obtenir des cultures après 24 heures d'étuve, tuant par injections intra-abdominales en 20 minutes, 200 à 300 kilogrammes de cobaye le don de $1/50^m$ de c^3 .

Ce bacille est très sensible à la chaleur, il périt à 58° .

Par contre sa toxine dont l'action se rapproche de celle de la muscarine est extrêmement résistante à tous les moyens habituels de stérilisation.

Un lait où cet agent aurait été cultivé serait donc aisément stérilisé, mais n'en demeurerait pas moins très toxique et capable d'occasionner de graves accidents.

Lorsqu'on considère la variété de maladies graves que peut engendrer l'ingestion du lait cru, on s'est demandé si, en le soumettant à l'action de la chaleur, on n'arriverait pas à le rendre, sinon complètement inoffensif, du moins impropre au développement des bactéries qui pourraient s'y trouver. C'est de cette idée que naquirent les différents procédés pour la stérilisation du lait, et le grand nombre d'appareils inventés nous montre combien le résultat obtenu jusqu'ici est encore imparfait.

Nous allons maintenant passer en revue les divers appareils ; et discuter leur valeur relative. Nous ne nous appesantirons que sur les méthodes dont nous nous sommes servis pour nos expériences, et ne donnerons qu'un aperçu du manuel opératoire des autres.



CHAPITRE 3

Manuel Opérateur

Parmi les procédés et appareils dont on se sert pour le lait, il en existe pour la simple pasteurisation, d'autres pour la stérilisation.

Dans les premiers, on porte le lait à 70° ou 75° et on le ramène subitement au refroidissement par un courant d'eau. Le *procédé Thiel*, qui est en usage en Allemagne, consiste à faire passer le lait sur une plaque métallique ondulée et chauffée à la vapeur, et à le refroidir immédiatement dans un récipient entouré de glace.

Parmi les seconds, nous avons l'appareil d'*Escherich*, qui se compose d'une marmite de porcelaine, avec couverture percée d'un trou central qu'on bouche avec un tampon d'ouate. A la partie inférieure de la marmite se trouve un robinet. Après la stérilisation au bain-marie à 100° pendant une demi-heure, on soutire le lait par le robinet inférieur, l'air qui rentre étant filtré par le bouchon d'ouate. Le désa-

vantage de cet appareil consiste en ce que le robinet de laiton, charge le lait de sels métalliques.

L'appareil de Soxhlet, qui est bien connu en France, est constitué par un bain-marie dans lequel plongent de petites bouteilles remplies au deux tiers de lait. Un petit disque de caoutchouc sert d'obturateur à la bouteille pour l'empêcher de se déplacer pendant que la vapeur et l'air s'échappent de la bouteille, on le coiffe d'un petit cylindre de métal armé de trois griffes.

L'appareil de Egli Sinclair n'est que le Soxhlet avec la différence que le lait passe directement du vase à la bouche de l'enfant, l'obturateur étant remplacé par une tétine en caoutchouc percé, sur laquelle on place une pince après la stérilisation.

Bethel fait bouillir le lait, et le charge d'acide carbonique par l'appareil du soda water, mais ce procédé est dispendieux parce qu'il nécessite l'emploi d'un appareil syphoïde, et de plus le lait s'échappe en mousse.

L'appareil de Gentile se compose essentiellement de petites bouteilles obturées avec un bouchon de caoutchouc, qui, après avoir été remplies de lait, sont soumises à un bain marie. Ces petites bouteilles sont graduées et les bagues du goulot de ces bouteilles sont planes et rodées. On les remplit aux deux tiers de lait et on les recouvre d'un obturateur en caoutchouc ayant la forme d'un champignon. La tige de

l'obturateur plonge dans la bouteille et sa partie supérieure repose sur la bague rodée qu'elle ne dépasse pas. On place ainsi les bouteilles dans un panier de fil de fer et on les plonge dans un bain marie dont le niveau arrive à peu près à la moitié de la bouteille. On porte à l'ébullition pendant trois quarts d'heure. L'air s'échappe en soulevant l'obturateur et au moment où on ôte les bouteilles, la pression atmosphérique applique le bouchon de caoutchouc sur le goulot, la tige de l'obturateur empêchant le déplacement latéral.

Par condensation de la vapeur, la pression atmosphérique fixe l'obturateur en le déprimant à son centre. Dès le refroidissement des bouteilles on les contrôle en vérifiant que l'obturateur adhère parfaitement à la partie rodée du goulot, et que le vide est parfait.

Cette dernière opération se fait par le marteau d'eau ; après avoir renversé la bouteille, on imprime une secousse brusque à son fonds, le liquide se déplace en masse et vient frapper les parois de la bouteille en produisant un claquement sec.

Pour rendre ces bouteilles facilement transportables, Gentile a joint à son appareil un cercle métallique s'appliquant exactement sur le bord de l'obturateur. On le fixe autour du goulot de la bouteille par deux petites lames verticales, dans lesquelles on passe une ficelle.

La méthode de stérilisation du lait à température inférieure à 100°, répétée toutes les vingt-quatre heures, n'est pas celle que bien des personnes jusqu'ici avait attribuée à Tyndall. Nous avons fait des recherches sur ce sujet et nous avons trouvé en effet, que Tyndall s'était occupé de la stérilisation par chauffes discontinues, mais à température *haute* et peu prolongée. Tyndall dans sa communication à la société philosophique de Londres s'explique comme suit :

« C'est un fait indiscutable que les microbes actifs sont détruits à une température inférieure à celle de l'eau bouillante. Il est aussi patent qu'une période définie, que j'ai appelée la période latente, est nécessaire à ce germe dur et résistant pour passer dans cette condition organique où il est le plus sensible à la chaleur. Il n'est pas douteux que plus un germe approche du moment où il devient organisme complet, plus il est susceptible à cette influence par laquelle cet organisme est si aisément détruit.

« On peut savoir par des recherches quel temps approximatif demande un germe pour passer de l'état de spore à l'état d'adulte. Admettons que le temps soit de vingt-quatre heures. En supposant qu'on applique la chaleur de l'eau bouillante, ou même une chaleur inférieure au spore, d'abord avant son développement final, lorsque toutes ses parties sont encore plastiques, enfin lorsque il est sur le point d'acquérir le

degré auquel une température de 140 Fah (60° cent.) lui est fatal, il est plus que probable qu'une température de 212 Fah (100° c.) ou de 200 Fah (environ 93° cent.) ou même une température de 150 Fah (66° cent.) si on l'applique assez souvent, et pendant un temps suffisant sera fatal au spore, et empêchera l'apparition de l'organisme encore plus sensible, que le spore était sur le point de produire.

« Je remplis vingt-quatre petites cornues avec une infusion de foin le 1^{er} février et je les soumis matin et soir à la température de l'eau bouillante pendant une minute. Le dernier chauffage eut lieu le 3 février au soir. L'ouverture des cornues avait été tamponnée avec de l'ouate ; l'air qui s'y trouvait n'avait pas été filtré, et comparativement on prit peu de soin à leur préparation.

« Après le dernier chauffage on les abandonna à la température d'une étuve à environ 90 Fah. (32° centig).

« Une semblable série de cornues, chargées en même temps de la même infusion fut soumise à une ébullition continue pendant dix minutes, et obturées pendant qu'elles bouillaient, et placées aussi dans une étuve. Deux jours après, les dernières préparations avaient toutes donné lieu sans exception à du trouble et de l'écume ; d'un autre côté douze des vingt-quatre cornues soumises à un temps plus court de chauffage demeurèrent brillantes et sans écume.

« A une autre expérience, je trouvais encore que les cornues qui avaient été soumises à l'ébullition pendant dix minutes étaient troubles et couvertes d'écume, tandis que deux mois après la préparation des autres, elles étaient encore brillantes et dépourvues d'écume.

« La raison en est claire. Par la première et brève application de la chaleur, les germes qui sont à ce moment plastiques, sont tués et avant qu'aucun des autres germes ne puissent se développer à l'état adulte de microbes, il sont soumis à une autre ébullition. Cette seconde opération tue le nombre de spores vivants qui sont près de leur développement. A chaque chauffe, le nombre d'organismes vivants est diminué, jusqu'à ce qu'ils soient tous complètement détruit.

« L'infusion si elle est protégée du contact de l'air reste pour toujours inaltérable, quoique, lorsqu'on l'ensemence de microbes ou de poussières sèches de laboratoire, le liquide stérile montre son pouvoir non seulement en permettant à l'organisme développé d'augmenter et de se multiplier, mais aussi en développant les germes de microbes desséchés. »

Ainsi qu'on le voit, Tyndall dans ses expériences ne faisait pas de stérilisation à basse température, (quoiqu'il dit que cette méthode pourrait avoir des avantages), mais à 100° ; seulement sa

chauffe se répétait plusieurs fois et ne durait qu'une minute.

C'est le contraire que nous avons recherché dans les expériences que nous relatons plus loin, nous efforçant d'obtenir une stérilisation par chauffes répétées à basse température et longtemps prolongées.

Le *bouchon de J. Hest* consiste essentiellement en un tube capillaire de verre replié sur lui-même, nombre de fois, et contenu dans une gaine métallique qui le protège des chocs, et qui se termine par un bouchon métallique encerclé de liège, avec lequel on obture le flacon de lait que l'on veut stériliser.

Hest est arrivé à la construction de ce bouchon après les expériences suivantes :

Ayant pris un tube de verre de 45 centimètres de long et de 5 millimètres de diamètre, il l'a replié quinze fois sur lui-même, de manière à former des coudes ou des U. Une des extrémités de ce tube, la plus longue, plongeait jusqu'au fond d'une bouteille remplie à moitié de bouillon, et était maintenue en place au moyen d'un bouchon ; à ce bouchon se trouvait un tube aspirateur de Mariotte. L'appareil contenant le bouillon ayant été stérilisé à l'autoclave, Hest mettait en rapport l'extrémité libre du tube avec un autre tube de même calibre ou à peu près. Ce second tube se trouvait en contact avec une capsule contenant du sable fin, de la terre sèche et

de la poussière à parties égales ; Hest alors aspirait l'air au moyen du tube de Mariotte.

Il a constaté que le bouillon restait complètement pur et limpide. Les bactéries contenues dans le mélange de la capsule ne remontaient pas au-delà de la douzième courbure. Jusqu'à sa huitième courbure les microbes étaient assez nombreux, mais à partir de cette courbure jusqu'à la dixième, ils diminuaient et, à la quatorzième et à la quinzième, il n'en existait plus du tout.

Deux mois après, se servant du même appareil et pensant que les microbes des courbures avaient eu le temps de proliférer, il fit une seconde aspiration, mais son bouillon resta tout de même clair et ne cultiva pas. En calculant la vitesse de montée des bactéries par rapport au temps employé, Hest trouve les résultats suivants :

QUANTITÉ D'AIR ASPIRÉ	TEMPS	NOMBRE DES COURBURES
200 cc.	10 minutes.	Courbures 2
400	10 —	— 4
600	10 —	— 6
800	10 —	— 8
800	5 —	— 10
800	2 1/2 —	— 8
800	1 —	— 12

Ayant fait des expériences comparatives avec des bouteilles stérilisées, bouchées avec son bouchon et d'autres bouchées avec de l'ouate, il a trouvé que dans son appareil, le bouchon restait stérile, tandis que l'ouate contenait des colonies de mycellium.

La description du fonctionnement de son appareil est expliquée par lui comme suit :

Que l'air est complètement dégagé de bactéries et de champignons qui s'y trouvent lorsqu'il passe dans un tube de 1 à 4 millimètres de diamètre intérieur à la vitesse de 1 à 2 cent. par seconde, à la condition que les parois du tube soient *lisses et sèches* et incurvées de façon à former quinze coudes verticaux. A chaque courbure il existe un point mort du courant, et les poussières et les microbes s'y déposent par leur densité même. Plus les courbures se rapprochent du bouchon, moins elles contiennent de bactéries et les deux ou trois dernières courbures n'en contiennent pas du tout.

Nous voyons par la description que nous donne Hest de son appareil, qu'il cherche à réaliser la filtration de l'air au moyen d'un tube capillaire, à parois *lisses et sèches*.

Mais lorsque nous le suivons dans ces expériences, nous voyons que le tube qu'il décrit comme ayant les parois *sèches*, les a en réalité *humides*, et qu'il refait alors la mémorable expérience que Pasteur entreprit pour prouver la non existence de la théorie

de la génération spontanée ; car, en soumettant son appareil rempli à moitié de bouillon à l'autoclave, il arrive nécessairement que le dégagement de vapeur d'eau humecte les parois du tube. Néanmoins nous ne pouvons ôter ses qualités au bouchon de Hest, et nous donnons les résultats que nous avons obtenus avec son appareil au prochain chapitre.

Stérilisation à l'autoclave.

Nous n'avons pas à décrire ici l'autoclave, c'est un appareil trop bien connu. Nous nous bornerons à donner simplement les quelques précautions à prendre pour son bon fonctionnement. Après y avoir placé les bouteilles, il faut chauffer en ayant soin de laisser ouvert le robinet jusqu'à ce que la vapeur s'en échappe régulièrement ; c'est à ce moment que l'appareil est purgé d'air et ne contient plus que de la vapeur d'eau.

On ferme alors le robinet, et on règle la chauffe à la température voulue. Dès ce moment on commence à évaluer le temps, et on continue à chauffer en maintenant la température et la pression toujours égales, pendant tout le temps donné.

Ces détails ont une grande importance, car si la vapeur d'eau n'était pas pure, les indications manométriques seraient modifiées et on ne pourrait être certain de la température de l'appareil.

Une fois le temps écoulé, on arrête de chauffer, et on laisse refroidir l'appareil jusqu'à 100°, en se gardant bien d'ouvrir le robinet avant que le mano-

mètre ne soit revenu à ce degré ; car si on le faisait, il se produirait une décompression brusque avec issue de vapeur, et les liquides mis à l'autoclave entreraient à l'ébullition, seraient projetés hors de leurs récipients, ou ceux-ci brisés. Nous tenions à rappeler ces précautions pour ceux qui ne sont pas habitués à se servir de cet appareil dont le bon fonctionnement ne peut-être obtenu qu'au prix de leur observation minutieuse et exacte ; car pour peu qu'on s'en écarte, le mélange de vapeurs d'eau et d'air donnera lieu à des pressions et à des températures éminemment variables.

La stérilisation ne peut être considérée comme commençante que lorsque tout l'air de l'appareil ayant été expulsé, la température est arrivée à celle voulue.

On voit par cette énumération, combien laisse encore à désirer la stérilisation du lait, et nous passons encore sous silence, nombre d'appareils.

Tous ces procédés ont certainement leur bon côté, mais la plupart d'entre eux, s'ils tendent à faire du lait un milieu privé de microbes, ôtent au lait sa constitution physiologique et chimique. Certains microbes résistent à la température où est porté le lait, d'autres sont détruits, mais leurs spores ne le sont pas. Dans les procédés où la température n'atteint pas 100°, quoiqu'on en dise, la stérilisation est

incomplète, surtout si elle dure moins d'un quart d'heure.

Dans ce qui suit, nous allons exposer les résultats de nos expériences ; nous n'avons pas cherché un mode opératoire qui stérilise le lait sans modifier ses caractères, mais un procédé qui donne le lait le plus stérile, et dont la composition approche cependant le plus possible de la normale.



CHAPITRE 4

Recherches personnelles

Nous avions, au début de nos recherches, l'intention de faire un travail beaucoup plus complet que celui que nous présentons aujourd'hui ; nous nous proposons, non-seulement d'élucider la question de stérilité plus ou moins relative du lait traité, mais encore dans chaque expérience, de compter le plus exactement possible le nombre de bactéries persistant dans le lait, et d'en déterminer leur nature.

Forcé par le temps restreint dont nous disposions d'abrégé cette étude, nous avons dû laisser absolument de côté la deuxième partie, nous bornant à ne nous occuper que de la présence ou de l'absence des germes, et de leur quantité très relative. C'est dans ce but que nous avons employé surtout des milieux solides de cultures, après dilution convenable des microbes à étudier ; c'est du reste la méthode qui convient le mieux pour la numération des colonies.

Nous avons été obligé, également, de laisser de

côté la question encore si complexe et non élucidée des microbes anaérobies qui existent dans le lait, mais qui nécessitent des recherches trop longues et trop fastidieuses pour que nous ayons pu même ébaucher ce chapitre.

Voici le manuel opératoire auquel nous nous sommes soumis à propos de chaque expérience.

Lorsqu'il s'agissait de dénombrer les colonies, nous procédions de la façon suivante : Après avoir, par un ensemencement préalable, déterminé la quantité très approximative des ferments dans un flacon, nous prélevions 1 c. c. de lait au moyen d'une pipette, et nous la diluions dans 9 c. c. de bouillon. Nous ensemencions alors 1 c. c. de ce bouillon dans 9 cc. de gélatine liquide et refroidie à environ 30°. Si le lait était pauvre en microbes, nous coulions cette gélatine dans une plaque de Pétri. Lorsque le lait était plus riche en microbes, nous reprenions à deux ou trois reprises 1 cc. de ce 2^{me}, puis d'un 3^{me} bouillon, que nous transportions dans 9 cc. de bouillon neuf, de manière à avoir des dilutions de plus en plus grandes, car, afin de numérer les colonies, il est indispensable que le dernier tube de gélatine en contienne assez peu pour qu'elles ne confluent pas sur la plaque de Pétri, et se trouvent assez espacées pour pouvoir être aisément comptées.

On peut par ce procédé très simple, comme on le voit, obtenir des dilutions au 1000°, au 10,000°, au

100,000^e et même plus, et arriver ainsi, par une simple multiplication, à connaître la teneur exacte du lait en ferments.

En répétant suffisamment ces expériences sur un même flacon de lait, on peut, d'autre part, avoir la plus grande probabilité de posséder sur les différentes plaques de Pétri, des spécimens de tous les différents microbes contenus dans le liquide primitif.

Ce procédé permet donc à la fois la numération et l'étude des espèces microbiennes. Cependant, les cultures sur gélatine devant être mises dans une étuve à basse température, demandent beaucoup plus de temps pour pousser que les cultures sur gélose qui peuvent être placées à 37°. Il faut attendre plus de huit jours avant de pouvoir espérer que le plus grand nombre des cultures se soient développées. En outre, d'une part, parmi ces cultures, il existe des champignons à extension très rapides, qui recouvrent, parfois en peu de temps, de grandes espaces, et peuvent ainsi dissimuler de petites colonies différentes, moins vivaces. D'autre part, un grand nombre de microbes liquéfient la gélatine; les godets ainsi formés, en s'étendant, et la gélatine liquifiée en coulant, ne tardent pas à amener une confluence des colonies voisines, de sorte que la plaque ne peut plus être utilisée après un laps de temps parfois très restreint. Ce second inconvénient pourrait être éliminé en se

servant de plaques de gélose, mais, dans ce cas, le premier argument conserverait toute sa valeur.

On voit donc que si le système de plaques est le meilleur pour la numération des microbes, il offre aussi quelques inconvénients, ce qui fait que nous avons limité le nombre de ces expériences. Ce procédé n'aurait eu de l'importance que si nous avions voulu isoler chaque espèce pour en faire une étude particulière. Mais le temps nécessaire pour aboutir à ces déterminations délicates nous faisant défaut, nous n'avons fait qu'un petit nombre d'expériences sur plaques de Pétri. Il nous importait, en effet, surtout, non pas d'avoir des chiffres absolus, mais des chiffres relatifs, avec les différents échantillons dont nous nous servions, puisque nous avons dû renoncer aux recherches qualitatives pour nous borner aux recherches quantitatives.

La culture sur gélose s'imposait donc afin de pouvoir cultiver à haute température et d'obtenir des résultats plus rapides. En ayant soin d'ensemencer un tube incliné de gélose avec une quantité suffisamment petite de lait qu'on étale soigneusement à sa surface, on obtient ainsi une espèce de petite plaque de Pétri, sur laquelle, si la semence a été assez parcimonieusement distribuée, on pourra approximativement se rendre compte de la quantité de colonies.

On ne trouvera donc pas dans la plupart de nos expériences des chiffres indiquant exactement le

nombre des microbes par centimètre cub³ de lait. Nous voulions simplement étudier la valeur des procédés les plus usuels de la stérilisation, et nous nous sommes borné le plus souvent à indiquer si les tubes de gélose, ersemencés toujours avec la même quantité donnée de lait, cultivait beaucoup, un peu, très peu ou pas du tout.

Nos expériences ont porté sur quatre modes différents. Nous avons expérimenté successivement le système de Gentile que nous avons décrit plus haut, et l'appareil de Hest, qui consistent tous deux en un chauffage prolongé à 100° dans des flacons bouchés de façons différentes.

A propos de ces expériences avec l'appareil Gentile, nous les avons faites, comme on le verra plus loin, en nous mettant le plus possible dans les conditions de l'alimentation du nouveau-né, c'est-à-dire en nous servant dans ces expériences soit du lait pur, soit du lait coupé à moitié ou au tiers d'eau.

Biedert ayant remarqué que le suc gastrique du veau détermine des coagulums plus complets et plus durs dans le lait de vache que dans le lait de femme, et l'assimilant au suc gastrique de l'enfant, conclut que la caséine du lait de vache est moins facilement digérée que la caséine du lait de femme. Tant que l'on ne pourra pas transformer la caséine du lait de vache en caséine du lait de femme, dit-il, il sera nécessaire de ne donner à l'enfant que la quantité de cette caséine qu'il pourra digérer. Lorsque

les selles de l'enfant ne contiennent pas de coagulums la caséine est digérée. Le lait de vache contient 4 % de caséine et celui de la femme 2 %. Il est donc nécessaire de délayer le lait. Mais sa valeur nutritive diminue de la quantité d'eau employée. Cependant M. Variot donne du lait pur aux enfants; il ne croit pas que l'excès de caséine puisse fatiguer leurs estomacs.

Afin d'éviter la contamination du lait par l'eau, il faut y mettre une eau privée de germes. La stérilisation de l'eau à l'autoclave et à l'ébullition présente souvent l'inconvénient de précipiter les sels calcaires, ce qui nécessiterait à la suite une filtration. Ayant à notre disposition de l'eau distillée, c'est avec celle-ci que nous avons fait nos expériences et coupé notre lait. On pourrait évidemment se servir d'eau filtrée sur une bougie de Chamberland, lorsqu'on dispose de cet appareil, à la condition de la nettoyer minutieusement et assez fréquemment.

Dans un autre ordre d'expériences, nous nous sommes attaché au lait stérilisé à l'autoclave. Nous signalerons rapidement ces expériences qui ont donné des résultats défavorables au point de vue des modifications chimiques et physiques du lait.

Enfin, nous avons appliqué la méthode des chauffes discontinues à basse température. Il ne saurait être ici question de la méthode de Tyndall, qui, si on l'appliquait exactement, consisterait à chauffer le lait pendant une minute à 100° pendant trois jours matin

et soir Il est évident qu'on se trouverait en présence des inconvénients que présentent tous les chauffages à haute température, c'est-à-dire des modifications chimiques considérables dans la composition du lait.

Appliquant à nos recherches les procédés opératoires dont on use en bactériologie pour la stérilisation de certains liquides altérables, tels que les sérums, nous avons essayé des stérilisations discontinues plus ou moins rapprochées, plus ou moins prolongées, mais à plus basse température, c'est-à-dire à 70°, 80° et 90°.

MÉTHODE DE GENTILE

Nous rappelons que cette méthode consiste à chauffer au bain-marie, dans l'eau bouillante, et dans une marmite fermée, des flacons remplis au 2/3 de lait et fermés par un obturateur de caoutchouc déposé à la surface du goulot. Après les trois quarts d'heure de chauffe, lorsqu'on laisse refroidir le liquide, la condensation des vapeurs contenues dans le flacon applique le bouchon à la surface du goulot, et obture hermétiquement la bouteille dans laquelle doit exister le vide. Il faut, avant de se servir de ce lait, et nous avons eu soin de le rechercher avant chaque expérience, s'assurer que le bouchage est parfait et que le vide y existe toujours. Dans ce but on recherche le marteau d'eau. Toute bouteille dans laquelle n'existerait pas le vide devra être rejetée.

Le lait ainsi obtenu est un peu modifié, la caséine est coagulée, cependant il n'a ni mauvais goût, ni mauvaise odeur, et l'expérience montre qu'ainsi préparé, il est assez bien toléré par les enfants.

Pour pouvoir être conservé, ce lait doit être rigoureusement stérile. Afin de nous en assurer, nous avons procédé à desensemencements méthodiques. Mais comme il aurait fallu un nombre considérable de tubes pour ensemençer tout un flacon, nous avons dû, comme nous le disions plus haut, nous borner à ensemençer une quantité minime, toujours équivalente, de lait, prélevée à la surface et au fonds. Dans les premières heures, même s'il restait quelques ferments, ceux-ci devaient être en bien minime quantité, et il eût été peu probable qu'on eût la chance d'en prélever dans une faible prise ; mais les chances augmentaient à mesure qu'on se trouvait à une époque plus éloignée de la stérilisation et que les premiers microbes avaient eu le temps de se multiplier. Les cultures devaient devenir positives, lorsque les bactéries étaient devenues assez nombreuses pour que 5 gouttes de lait en contiennent au moins une ou deux.

Ne pouvant d'avance prévoir la teneur de chaque flacon en agents parasitaires, nous avons dû, dans chaque opération, stériliser de la même façon et simultanément une vingtaine de flacons de lait. Il était vraisemblable que dans chacun de ces flacons,

un nombre approximatif de germes avait résisté à la stérilisation et qu'ils étaient par conséquent comparables entre eux.

Deux heures après la chauffe, nous ouvrons un flacon et nous prélevons 5 gouttes de surface et 5 gouttes de fonds que nous ensemencions sur deux tubes de gélose. Toutes les 2 heures nous répétons la même expérience avec un nouveau flacon de la même chauffe.

Ces expériences ont toujours été poursuivies jusqu'à la 10^e heure, mais parfois au-delà. Nous faisons donc ainsi pour chaque expérience au moins 5 tubes de surface et 5 tubes de fonds.

Ces tubes étaient placés à l'étuve à 37° et examinés tous les jours, jusqu'à ce que l'on vît apparaître des cultures sur l'un d'eux. En ayant soin de répéter ces expériences à plusieurs reprises, on est en droit d'admettre que le premier tube donnant un résultat positif, correspondait à un flacon dans lequel existait en moyenne un microbe par 5 gouttes. Les tubes restant stériles correspondaient à des flacons dont la contenance en microbes aérobies était moins de un par 5 gouttes. Plus le lait stérilisé contenait encore de germes après la chauffe, plus cette proportion de un microbe par 5 gouttes devait être obtenue rapidement.

En résumé, en suivant ce procédé, plus le nombre de microbes ayant résisté à la stérilisation était

grand, plus les ensemencements donnaient rapidement des résultats positifs. On peut considérer qu'un lait qui, ensemencé à la deuxième heure, donne lieu à une culture, était stérilisé d'une façon beaucoup plus incomplète qu'un lait dont 5 gouttes ne donnent un résultat positif qu'à la huitième ou à la dixième heure.

Cette estimation est évidemment très imparfaite et grossière, mais suffisante cependant lorsque les expériences sont assez fréquemment répétées pour comparer en gros les résultats relatifs des différents modes de stérilisation.

Nous avons exposé plus haut notre procédé pour l'ensemencement; maintenant que l'on connaît les raisons qui nous ont fait choisir ce mode opératoire, il ne nous reste plus qu'à donner les résultats obtenus.

Rappelons que c'est à propos de l'appareil de Gentile que nous avons étudié comparativement le lait pur et le lait coupé à moitié et au tiers. Nous avons donc fait avec cet appareil trois séries d'expérience dont nous donnons ici les détails.

Première expérience. — Lait pur.

Stérilisation au bain-marie pendant trois quarts d'heure.

— Ensemencement de 5 gouttes de lait toutes les deux heures.

Le lendemain et le surlendemain de l'expérience, aucun des tubes n'avait poussé.

Le troisième jour, les tubes de 3 h., 5 h., 14 h., surface, et 3 h., 5 h. et 30 h., fonds, avaient poussé.

Le quatrième jour, tous les tubes avaient poussé.

Deuxième expérience. — *Lait pur.*

(Même technique que pour la 1^{re} expérience)

Le lendemain tous les tubes avaient poussé.

Cette expérience montre qu'ici la stérilisation a été incomplète puisque les cultures ont été positives dans tous les tubes.

Si dans la première expérience tous les tubes n'ont pas poussé avec la même rapidité, nous sommes en droit de croire que dans les tubes qui ont poussé dès le deuxième jour, il existait encore des microbes à l'état adulte, et en voie de prolifération, tandis que dans ceux qui ont cultivé plus tard ces microbes étaient encore à l'état de spore.

Troisième expérience. — *Lait coupé à moitié d'eau distillée non bouillie (Même technique)*

Quatre jours après, les tubes étaient intacts, rien n'avait poussé.

Quatrième expérience. — *Lait coupé à moitié*
(Même technique)

Le lendemain les tubes étaient limpides et transparents, rien n'avait cultivé.

Le surlendemain nous avions les tubes de 2 h., 4 h., 6 h. fonds, et 8 h. surface et fonds qui avaient cultivé. Les autres tubes restant clairs.

Le neuvième jour après l'ensemencement un seul des

tubes qui n'avait pas cultivé s'était revêtu d'une colonie, celui de 10 h. fonds.

Dans cette dernière expérience on est en droit de croire que le tube qui a cultivé si tardivement aura été souillé involontairement au cours de nos recherches, et postérieurement à l'ensemencement.

Cinquième expérience. — *Lait coupé au tiers d'eau distillée non bouillie (Même technique)*

Le lendemain les tubes de 2 h. surface et fonds, 6 h. surface avaient seuls poussé.

Le surlendemain tous les tubes avaient cultivé sauf le tube de 10 h. fonds.

Sixième expérience. — *Lait coupé au tiers (Même technique)*

Trois jours après l'ensemencement le tube de 12 h. fonds présentait seul quelques colonies, six jours après, pas de changement, les autres tubes n'avaient rien donné.

Dans cette expérience nos résultats ont été plutôt bons, un seul des tubes, celui de 12 h., ayant cultivé. Nous nous demandons ici s'il ne s'agirait pas d'une souillure accidentelle pendant nos manipulations, car en présence de la stérilité des autres tubes, cette hypothèse pourrait jusqu'à un certain point être admise, surtout appuyée par le résultat analogue de notre troisième expérience. Cependant nous pour-

rions avoir affaire à un microbe que nous avions prélevé avec nos cinq gouttes de lait. Si cette dernière idée était la vraie, nous aurions obtenu alors un lait dont la contenance en microbes aura été si minime, que nous n'avons pu en prélever qu'un seulement, à la 12^e heure après la stérilisation.

Septième expérience. — *Lait coupé au tiers*
(Même technique)

La bouteille est abandonnée pendant dix jours dans le laboratoire, à la température ordinaire de la chambre. Au 10^e jour, on prélève cinq gouttes de lait qu'on ensemence sur un tube de gelose. Ce tube demeura parfaitement stérile.

Quoique ce résultat soit isolé, étant donné que le temps écoulé entre la stérilisation et l'ensemencement aurait dû permettre aux microbes de proliférer, l'absence de culture semble indiquer que la stérilisation a été, au moins dans cette expérience complète. On pourrait encore objecter que, étant donné le vide maintenu dans la bouteille, les microbes aérobies parmi lesquels se range le subtilis n'ont pas pu proliférer ; mais les anaérobies auraient pu amener une altération du liquide, ce qui n'a pas eu lieu, le lait étant resté absolument intact. On peut donc conclure qu'ils avaient tous été complètement détruits. Quant aux aérobies s'ils ne peuvent proliférer dans le vide, leurs spores lorsqu'elles existent, et c'est le cas du subtilis, peuvent longtemps se conserver à

l'abri de l'air. Cette expérience semble donc prouver que même dans ce cas, il n'existait même plus des spores de subtilis, car celles-ci auraient donné lieu à une culture même après un long séjour dans le vide.

Les écarts qui existent entre nos diverses expériences, nous croyons pouvoir les attribuer au lait lui-même et presque pas aux manipulations auxquelles nous l'avons soumis ; car le lait dont nous nous sommes servi est celui fourni à la Maternité de la Charité, et nous n'ignorons pas que non seulement il ne provient pas des mêmes animaux, mais qu'il pouvait avoir été similé par des contacts impurs avant d'être livré.

Peut être l'eau distillée dont nous nous sommes servi pour nos coupages n'était-elle pas pure. Mais néanmoins, si nous considérons les résultats que nous a donné le lait coupé à moitié, à la troisième et à la quatrième expérience, nous voyons que la première fois nos résultats ont été négatifs après quatre jours ; à la seconde, les tubes n'ont commencé à cultiver que le troisième jour. Dans le lait pur et coupé au tiers nous voyons que nos résultats sont instables, bons à une expérience, mauvais à une autre, ce qui nous fait penser que la dilution à moitié permet à l'enfant d'absorber la quantité qui lui est nécessaire dans les vingt quatre heures, le lait restant stérile pendant ce temps, et les spores ne culti-

vant que plus tard. Mais si nous regardons le lait comme excellent à ce point de vue, c'est-à-dire dégagé de microbes, nous ne pouvons dire qu'il est physiologique, car nous savons que la caseïne du lait coagule vers 70° et que notre lait a subi une température d'environ 100° pendant trois quarts d'heure.

Nous avons parlé plus haut des ensemencements sur plaques de gélatine. Nous n'en avons fait qu'un petit nombre et nous donnons ci-après nos résultats. Le développement d'un grand nombre de champignons à extension rapide, et la liquéfaction de la gélatine par certaines colonies de microbes nous ont forcé à limiter ces expériences. Nous nous sommes servi de l'appareil Gentile pour la stérilisation du lait employé à ces expériences.

Huitième expérience. — *Lait pur*

(Stérilisation au bain-marie pendant 3/4 d'heure à 100°.

— Ensemencement d'une plaque de Petri avec 1/100^{me} de cc.

Nous avons pu numérer quatre sortes de champignons, et une colonie microbienne jaune grumelleuse.

Neuvième expérience. — *Lait pur*

(Même technique, dilution au 100^{me}).

Un champignon et une colonie microbienne.

Dixième expérience. — *Lait coupé à moitié*

(Même technique, dilution au 100^{me}).

Quatre champignons, quatre colonies microbiennes d'aspects différents.

Onzième expérience. — *Lait coupé à moitié*

(Même technique, dilution au 100^{me}).

Quatre gros champignons et beaucoup d'autres plus petits. Une colonie microbienne.

Comme nous le disons plus haut, le défaut de temps nous a empêché de déterminer la nature de tous les microbes que nous avons rencontrés ; néanmoins nous pouvons citer comme ceux que nous avons vus le plus souvent, le *subtilis* en première ligne. Dans trois cas nous avons trouvé un *staphylocoque*, mais nous ne pouvons rien dire de sa virulence, n'ayant pas fait d'inoculations. Nous n'avons jamais rencontré de streptocoques. Nous croyons avoir rencontré du *bactérium coli*, ou tout au moins des microbes qui présentaient tous ses caractères. Le *proteus* n'a été représenté que par une forme de passage se rapprochant du subtilis. Cependant, d'après M. Straus, ce micro organisme doit plutôt être rangé dans la catégorie des protéés. La fréquence du *proteus* autour de nous, fréquence aussi grande que celle du subtilis, et la résistance de ses spores à la destruction pourrait être une cause de danger, car, si jusqu'ici il a été rangé dans la

catégorie des microbes saprophytes, des expériences récentes tendent plutôt à le faire rentrer dans la classe des pathogènes lorsqu'il est associé à d'autres espèces.

II. — MÉTHODE DES CHAUFFES DISCONTINUES A BASSE TEMPÉRATURE

Rappelons que cette méthode consiste à chauffer des flacons de lait obturés avec un bouchon en caoutchouc dans un bain-marie à une température inférieure à celle de l'eau bouillante, toutes les vingt-quatre heures, pendant trois jours. Nous avons fait des expériences successivement à 70°, 80° et 90°. Nous faisons nosensemencements toutes les deux heures, commençant 2 heures après la chauffe. Nos résultats ont été les suivants.

Douzième expérience. — *Lait pur*

Une chauffe à 70° pendant une demi-heure

Le lendemain de l'ensemencement, les tubes de 2 h. fonds, 10 h. surface et fonds et 12 h. fonds avaient poussé.

Deux jours après tous avaient poussé, sauf le tube de 12 h. surface qui était douteux.

Le troisième jour tous avaient cultivé.

Treizième expérience. — *Deux chauffes à 70°*

(Même technique)

Le lendemain les tubes de 2 h. surf. 8 h. surf. et 12 h. fonds avaient poussé.

Sénèque

Le deuxième jour, avaient cultivé les tubes 2 h. surf., 6 h. surface et fonds, 4 h. surface et 12 h. surface et fonds.

Le troisième jour tous avaient cultivé sauf le tube de 4 h. fonds.

Le quatrième jour tous avaient cultivé.

Quatorzième expérience. — *Trois chauffés à 70°*
(Même technique)

Le lendemain, certains des tubes paraissent douteux, sans encore rien de caractéristique.

Le deuxième jour, tous les tubes avaient poussé au grand complet.

Quinzième expérience. — *Trois chauffés à 70°*
(Même technique)

Les résultats que nous avons obtenus avec les deux premières chauffés à 70° étant complètement défavorables pour cette nouvelle série nous n'avonsensemencé le lait qu'à la troisième chauffe de 70°.

Le lendemain de l'ensemencement, nous avions les tubes 2 h. fonds, 4 h. surface et fonds, 6 h. fonds et 10 h. surface qui avaient poussé.

Le deuxième jour, des tubes qui n'avaient rien donné la veille, les tubes de 8 h. surface et fonds avaient cultivé.

Le septième jour, tous avaient cultivé.

Seizième expérience. — *Une chauffe à 80°*
(Même technique)

Le lendemain, tous les tubes avaient poussé.

Dix-septième expérience. — *Deux chauffes à 80°*
(Même technique)

Le lendemain, avaient poussé les tubes de 2 h. surface et fonds, 8 h. surface et fonds.

Le deuxième jour, nous avons en plus une culture sur le tube de 10 h. surface.

Le troisième jour, tous avaient poussé sauf les tubes de 10 h. fonds et 6 h. surface.

Dix-huitième expérience. — *Trois chauffes à 80°*
(Même technique)

Le lendemain seul le tube de 2 h. fonds avait poussé.

Le deuxième jour nous avons des cultures sur les tubes de 2 h. surface et fonds.

Le troisième jour tous avaient poussé.

Dix-neuvième expérience. — *Une chauffe à 80°*
(Même technique)

Le lendemain de l'ensemencement tous les tubes avaient poussé.

Vingtième expérience. — *Deux chauffes à 80°*
(Même technique)

Le lendemain nous n'avions que les tubes de 2 h. surface et fonds qui avaient cultivé.

Le troisième jour tous avaient cultivé.

Vingt-unième expérience. — *Trois chauffes à 80°*
(Même technique)

Le lendemain les tubes de 2 h. surface et fonds, 4 h. fonds, 6 h. surface et 10 h. fonds avaient poussé.

Le deuxième jour tous les tubes avaient poussé.

En comparant les diverses expériences de la série à 80° nous voyons que les trois chauffes semblent identiques, c'est-à-dire que le deuxième jour ou le troisième jour tout les tubesensemencés avaient poussé.

Vingt-deuxième expérience. — *Une chauffe à 90°*
(Même technique)

Le lendemain aucun des tubes n'avait poussé.

Deux jours après l'ensemencement les tubes de 2 h. surface, 6 h. surface et fonds avaient cultivé.

Le troisième jour tous avaient poussé.

Vingt-troisième expérience. — *Deux chauffes à 90°*
(Même technique)

Le lendemain les tubes de 10 h. surface et fonds avaient seuls cultivé.

Le deuxième jour tous avaient cultivé.

Vingt-quatrième expérience. — *Trois chauffes à 90°*
(Même technique)

Le lendemain aucun des tubes n'avait cultivé, mais cependant le tube de 8 h. surface semblait un peu trouble.

Le deuxième jour ce tube présentait des cultures et les tubes de 10 h. surface et fonds avaient aussi cultivé.

Le quatrième jour tous les tubes avaient cultivé.

Vingt-cinquième expérience. — *Une chauffe à 90°.*
(Même technique)

Le lendemain de l'ensemencement les tubes de 2 h. sur-

face et fonds, 4 h. surface et fonds et 6 h. surface et fonds avaient poussé.

Le deuxième jour tous les tubes avaient cultivé.

Vingt-sixième expérience. — *Deux chauffés à 90°.*

(Même technique)

Le lendemain un seul des tubesensemencés avait cultivé celui de 2 h. surface.

Le surlendemain tous avaient poussé.

Vingt-septième expérience. — *Trois chauffés à 90°.*

(Même technique)

Le lendemain tous les tubes avaient poussé sauf ceux de 4 h. fonds, 6 h. surface et 10 h. surface et fonds.

Le deuxième jour, de ceux qui n'avaient pas cultivé, seul celui de 6 h. surface ne présentait rien, tous les autres avaient cultivé.

Cinq jours après tous avaient poussé.

Cette méthode de stérilisation, selon nous, paraît défectueuse, en ce sens que, si elle tend à ne pas changer ni la couleur, ni la saveur du lait, elle dénature sa composition physiologique absolument comme les autres procédés où l'on soumet le lait à l'ébullition ou au bain-marie, car comme nous l'avons déjà dit, la caséine du lait coagule vers 70°.

Mais admettons qu'avec les chauffés à 70° nous ne déaaturions pas la composition chimique du lait, ce procédé n'en est pas moins défectueux, car non-seulement cette température est insuffisante

à la destruction des microbes qui peuvent se trouver dans le lait, témoin les résultats de nos recherches, mais aussi nous savons très bien que ces expériences ne peuvent être faites que dans un laboratoire, et que, dans les familles, on ne pourra pas s'occuper à stériliser le lait d'une façon si minutieuse, et surveiller le thermomètre pour l'empêcher de monter au-delà du degré voulu. La stérilisation à 80° est non seulement insuffisante par rapport aux microbes, mais elle altère aussi la composition du lait. — La stérilisation continue à 90° pourrait donner de bons résultats, mais il faudrait peut être ne pas s'arrêter à trois chauffes et en faire cinq, six ou huit ; mais alors cette pratique ne saurait être que du domaine des laboratoires. Cependant nous ne devons pas oublier que certains microbes résistent à cette température de 90°, puisqu'il en existe qui nécessitent une température de plus de 100° pour leur destruction, témoin le *thyrothrix-tenuis* et ses spores qui demandent une température de 115° (Duclaux). Peut-être la température de 90° répétée six ou huit fois de suite réussirait-elle à rendre le lait stérile, mais nous ne voulons rien affirmer, nous émettons une simple hypothèse.

III. — STÉRILISATION A L'AUTOCLAVE.

Nous ne pensons pas devoir ici répéter les précautions nécessaires au bon fonctionnement de cet appareil, nous les avons émises dans le précédent

chapitre. De plus l'autoclave est d'usage trop journalier pour en décrire le mode opératoire, nous passons directement à nos résultats.

Nous avons soumis quelques bouteilles de lait, toujours obturées avec un bouchon de caoutchouc, à la stérilisation par l'autoclave ; mais nous ne faisons que mentionner ce mode. Le lait, à sa sortie de cet appareil, présente une légère couleur jaune, de plus son goût se trouve tant soit peu altéré et il nous semble d'une consistance un peu plus épaisse qu'à l'ordinaire. Vu les inconvénients que nous lui avons trouvé, nous nous sommes dispensé d'en faire des cultures sachant que ce lait, s'il était stérile, devait être non-seulement indigeste, mais de saveur désagréable.

La coloration du lait a été attribué à une altération soit de la lactose, soit de la caséine. Des expériences concluent que cette coloration jaune est due à l'oxydation de la lactose en présence de sels alcalins. Cette oxydation donne lieu à la formation d'acides gras, entre autres à de l'acide formique dont la présence suffit à expliquer la coagulation de la caséine, laquelle n'est pas altérée, mais simplement teinte en jaune par les corpuscules brun foncé formés aux dépens de la lactose.

IV. — BOUCHON DE HEST. — FILTRATION DE L'AIR

Ce procédé, comme nous l'avons dit, consiste en un bouchon métallique encerclé de liège dans lequel

se trouve un tube capillaire enroulé sur lui-même, de manière à former 15 coudes verticaux. Après avoir obturé les flacons de lait qui devaient être stérilisés avec ce bouchon, nous les avons soumis à un bain-marie de 100° pendant trois quarts d'heure.

Nos résultats ont été les suivants :

Vingt-huitième expérience. — *Lait pur*

(*Même technique que plus haut pour les ensemencements*)

Le lendemain de l'ensemencement, les tubes de 2 h. sur 4 h. fonds et 8 h. fonds avaient cultivé ; celui de 6 h. fonds semblait douteux.

Le deuxième jour nous avons en plus les tubes de 4 h. surface, 6 h. fonds, 8 h. surface et 10 h. fonds. Le tube de 6 h. surface présentait un léger nuage, mais on ne pouvait affirmer s'il existait une culture.

Le troisième jour tous les tubes avaient cultivé sauf ceux de 2 h. fonds et 10 h. surface.

Nous avons aussi conservé une bouteille de ce lait pendant une semaine ; au bout de ce temps, ce lait n'avait pas changé d'aspect, mais son odeur était un peu forte et son goût paraissait un peu altéré.

En résumé, dans nos expériences avec le bouchon de Hest, tous les tubes ont cultivé sauf deux. Nous n'avons pas eu ici comme dans le système de Gentile des séries blanches, où aucun tube n'avait poussé.

En présence de ces résultats, nous nous demandons si c'est la stérilisation qui a été incomplète, ou

si c'est le mode d'obturation qui est défectueux. A comparer les résultats de cette expérience avec ceux obtenus avec la méthode Gentile, où le lait est conservé dans le vide, nous voyons que les cultures ont été sensiblement les mêmes.

Dans la méthode de Gentile, le lait, plus ou moins parfaitement stérilisé, est conservé à l'abri de l'air ; les microbes aérobies ne peuvent se développer avant l'ouverture de la bouteille et le lait se conserve plus longtemps. Dans la méthode de Hest le lait reste en contact avec l'air, et les aérobies peuvent se développer ; il est évident que ce lait présentera des conditions plus favorables que le précédent au développement des acrobis qui pourraient avoir résisté à la stérilisation.

Cependant quel qu'ait pu être le résultat de nos expériences, nous sommes complètement contre la méthode de stérilisation du lait longtemps d'avance. Selon nous, le lait doit être stérilisé tous les jours, et on ne doit en préparer que la quantité nécessaire à l'enfant dans les vingt-quatre heures, car quelles que soient les garanties offertes par les laits stérilisés du commerce, nous ne savons si ce lait cultiverait ou non, et dans le doute, le mieux est de stériliser son lait soi-même tous les jours.

CONCLUSIONS

I. La stérilisation doit être maintenue.

II. — Le procédé Gentile, procédé le plus courant, quoique altérant la composition chimique du lait, présente les meilleures garanties quant à la destruction des microbes ou spores pouvant se trouver dans ce liquide. Ce lait n'a ni odeur, ni saveur, ni couleur particulière, et semble être assez bien toléré par les enfants.

Tant qu'un nouveau procédé, permettant au lait de garder ses propriétés physiologiques n'aura pas été inventé, nous croyons que cet appareil réalise le mieux nos desiderata.

Le lait coupé d'eau distillée à moitié, et stérilisé d'après cette méthode, nous a donné de bons résultats; mais nous ne saurions le préconiser jusqu'au sevrage, car l'enfant ne pourrait se contenter de ce lait qui serait trop faible pour son âge, ou bien il faudrait lui en donner trop.

III. — La méthode de stérilisation par chauffes à

basse température nous ayant donné des résultats médiocres, nous ne saurions en recommander l'usage, à moins de continuer les chauffes cinq à six jours de suite; mais alors cette méthode n'appartiendrait plus au domaine pratique.

IV. — Les résultats que nous a donnés le bouchon de J. J. Hest, étant sensiblement les mêmes que ceux obtenus avec l'appareil de Gentile, cette méthode ne nous semble pas inférieure, sauf qu'elle est plus compliquée.

V. — Quant à la stérilisation par l'autoclave, nous la rejetons absolument, car non seulement elle dénature la composition physiologique du lait, mais elle altère et sa saveur, et sa couleur, et son odeur, et sa densité.

Vu : Le Président de la Thèse,

DEBOVE

Vu : Le Doyen,

BROUARDEL

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

GRÉARD.



INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Barbier*. — Revue clin. et therap., 1894.
2. *Bieder*. — Berl. Klin. Woch, oct. 1894.
3. *Bitter*. — Zeitsch f. hyg. VIII, 1891.
4. *Bourquelot*. — Revue scient. Le microbe du lait bleu, 1884.
5. *Chavanne*. — Th. Paris, 1893.
6. *Duval*. — Acad. Sciences, juin 1895.
7. *Duclaux*. — Le lait.
8. — Lait stérilisé. Ann. Inst. Past., 1895.
9. — Digestibilité du lait stéril. Ann. Inst. Past. 1895.
10. *Ernst*. — Transact. of Amer. phys. 1889.
11. *Escherich*. — Berl. klin. Woch, 1890.
12. — Munch. med. Woch, 1891.
13. *Egli Sinclair*. — Corresp. f. schweitzer Aertz. 1889.
14. *Gillet*. — Revue clin. et therap. 1894.
15. *Hankin*. — Brit. med. Journ. Janvier 1894.
16. *Hesse*. — Zeitsch f. Hyg. IX. 2. 1891.
17. — Zeitsch f. Hyg. 1893.
18. — Hyg. Rundsch. 1891. 1.
19. *Hueppe*. — Berl. klin. Woch. 1891.
20. *Jeffriès*. — Amer Journ. of the med. soc. 1888.
21. — *Jensen*. — Rev. sciences med. t. 48, p. 149.
22. *Kayser*. — Le microbe de l'acide lactique. Ann. Inst. Past. 1894.

23. *Klein*. — 19 th. Annual report of the Board, 1889-1890.

24. *Lait*. — Dictionnaire med. et chir.

25. — Dictionnaire Dechambre.

26. *Lesage*. — Th. Paris, 1889.

27. *Lœffler*. — Berl. Klin. Woch. 1890.

28. *Marfan*. — Journ. méd. hôpitaux. Juillet 1896.

29. *Pasteur*. — Ann. chim. et phys. 1862.

30. — Bull. acad. med. 1878.

31. — Bull. acad. sciences, 1866.

32. *Proust*. — Revue d'hygiène, 1888.

33. *Pêtre*. — Thèse Paris, 1894.

34. *Rouvier*. — Le lait.

35. *Straus*. — La tuberculose et son bacille.

36. — Arch. de méd. expériment. et anat. path. 1890,

37. *Soxhlet*. — Munch. med. Woch. 1891.

38. *Spillman*. — Congrès pour l'étude de la tub. 1888. Paris.

39. *Thorne thorne*. — Diphthérie, 1891.

40. *Tyndall*. — Phil. trans. Roy. soc. Londres, 1877.

41. *Van Hest*. — Bakterienluftfilter und Bakterien luftfilterverschluss. Iéna, 1895.

42. *Virchow*. — Path. des tumeurs, trad. fr. 1871.

43. *Wurtz*. — Arch. med. exp. 1891.

44. *Vaughan et Perkins*. — Sur un bacille trouvé dans la crème et le fromage, produisant un poison. Archiv. für Hygiène 1896.

